

5 **Verfahren zur quantitativen Bestimmung viraler Partikel mit
cholesterinhaltiger Hülle**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Be-
stimmung viraler Partikel mit cholesterinhaltiger Hülle unter
10 Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Filipin.

Hintergrund

Virusquantifizierung

15 Die Quantifizierung viraler Gesamtpartikel ist im Vergleich
zur Bestimmung der Anzahl infektiöser viraler Partikel rela-
tiv aufwendig. Der Nachweis von retroviralen Partikeln in
Zellkulturüberständen wird zum einen eingesetzt, um eine mög-
liche Kontamination mit Retroviren auszuschließen, und zum
20 anderen, um die Quantität und Qualität der Virusproduktion
durch Verpackungszellen zu überprüfen. Eine Kontamination mit
Retroviren wird zumeist über die Aktivität der viralen rever-
sen Transkriptase im Überstand nachgewiesen [85, 106] (ein
Literaturverzeichnis mit detaillierten bibliographischen An-
25 gaben findet sich am Ende der Beschreibung). Für die Quanti-
fizierung der Produktion viraler Gesamtpartikel stehen ver-
schiedene Methoden zur Verfügung. Neben der erwähnten Aktivi-
tät der reversen Transkriptase werden die Bestimmung der vi-
ralen "strong-stop"-cDNA, elektronenmikroskopische Untersu-
30 chungen und immunhistochemische Färbungen von Proteinen auf
der Virusoberfläche für eine Quantifizierung der Gesamtparti-
kel eingesetzt [7, 84, 85, 103].

Diese Methoden lassen sich nach ihrem Prinzip in zwei Arten
35 klassifizieren. Zum einen handelt es sich um indirekte Quan-

5 tifizierungsmethoden, bei denen von viralen Enzymaktivitäten
 oder dem Nukleinsäuregehalt auf die Anzahl der viralen Parti-
 kel geschlossen wird. Zum anderen sind es direkte Methoden,
 die der Sichtbarmachung der viralen Partikel dienen. Zur er-
 sten Klasse zählen der Nachweis der viralen RNA, der viralen
 10 "strong-stop"-cDNA und der Aktivität der viralen reversen
 Transkriptase [84, 85, 143, 144]. Elektronenmikroskopische
 Untersuchungen und immunhistochemische Färbungen der viralen
 Envelope-Proteine auf der Virusoberfläche zählen zur zweiten
 Klasse der verwendeten Methoden [103, 7]. Die Vorteile der
 15 indirekten Methoden liegen in ihrer relativ einfachen Durch-
 führung und in der schnellen Quantifizierung einer großen
 Probenzahl. Der Nachteil dieser Art der Partikelzahlbestim-
 mung liegt darin, daß sie nur einen ungefähren Anhaltspunkt
 für die Anzahl der freigesetzten Viren bietet und, wie im
 20 Rahmen der Untersuchungen zur Erfindung gezeigt, zum Teil
 zelltypspezifische Faktoren zur Berechnung der Gesamtparti-
 kelzahlen notwendig sind. Meist wird z.B. davon ausgegangen,
 daß 1% der infektiösen Retroviren "strong-stop"-cDNA enthält,
 unabhängig von der Zelllinie und den Produktionsbedingungen.
 25 Die mit der Erfindung vorgelegten Daten zeigen jedoch, daß je
 nach Art der Produktionszelllinie der Anteil von infektiösen
 Viren an den cDNA-haltigen Partikeln unterschiedlich hoch
 ist. Für die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 konnte in
 mehreren Experimenten nachgewiesen werden, daß in etwa der
 30 Hälfte der infektiösen Partikel die "strong-stop"-cDNA enthal-
 ten ist. Dies widerspricht den Daten anderer Arbeitsgruppen,
 die zeigten, daß circa 1% der Gesamtpartikel infektiös sind
 [84, 149]. Für eine exakte Quantifizierung der viralen Ge-
 samtpartikel mit dieser Methode ist es somit notwendig, einen
 35 zelltypspezifischen Faktor zu berücksichtigen. Dieser ist
 jedoch nur mit Methoden zu bestimmen, die alle viralen Parti-
 kel erfassen können, wie die direkten Methoden. Aber elektro-

5 nenmikroskopische Untersuchungen z.B. weisen einen nicht un-
 erheblichen Geräte- und Materialaufwand auf. Die von Pizzato
 et al. [7] entwickelte immunhistochemische Färbungen von Vi-
 ren ist dagegen relativ schnell und einfach durchzuführen,
 erfordern aber z.T. einen erheblichen Aufwand bei der Opti-
 10 mierung der Färbungen und sind auf die Existenz eines ent-
 sprechenden Antikörpers gegen virale Oberflächenproteine an-
 gewiesen.

Grundlage der Filipinfärbung

15 Bei der Bildung und der Freisetzung der Retroviren wird die
 virale Membran aus der Plasmamembran der Produktionszelle ge-
 bildet. Diese Umhüllung des Virus gleicht in der Zusammen-
 setzung den Membranbereichen, in denen die Ausknospung des
 Virus stattgefunden hat [46]. Bestandteil ist neben Pro-
 20 teinen, Sphingo- und Glykolipiden auch Cholesterin. Dieses
 Lipid ist ein essentieller Bestandteil eukaryotischer Zellen,
 an das spezifisch Filipin bindet. Filipin wurde aus dem Kul-
 turüberstand von *Streptomyces filipinensis* isoliert, besteht
 aus einem 35 gliedrigen Lacton-Ring und gehört damit zur
 25 Gruppe der Polyen-Makrolid-Antibiotika [145]. In früheren Ar-
 beiten konnte gezeigt werden, daß Filipin mit dem Cholesterin
 der äußeren Hülle von Retroviren und anderen umhüllten Viren
 einen Komplex bildet [146, 147]. Die Membranen der Viren
 dienten dabei zur Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktio-
 30 nen mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Eine Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines
 schnell und einfach durchzuführenden, aber trotzdem verläß-
 lichen Verfahrens bzw. Methode zur quantitativen Bestimmung
 35 viralen und bakterieller Partikel.

5 Erfindungsgemäß gelöst wird diese Aufgabe durch eine Methode zur Quantifizierung viraler oder bakterieller Partikel mit cholesterinhaltiger Hülle, bei der man die Partikel mit einem fluorogenen Polyen-Macrolid anfärbt und danach die Fluoreszenzsignale der einzelnen Partikel quantitativ erfasst.

10

Erfindungsgemäß kann man die Methode auf Retroviren, Orthomyxoviren, Paramyxoviren, Arteriviren, Togaviren, Bunyaviren, Rhabdoviren, Filoviren, Arenoviren, Coronaviren, Herpesviren, Flaviviren, Hepadnaviren, Pockenviren oder Iridoviren anwenden.

15

Insbesondere kann man erfindungsgemäß die Methode auf HIV, Masernvirus, Influenza-Virus, Maus-Leukämie-Virus oder Mykoplasmen anwenden.

20

Bei der erfindungsgemäßen Methode kann man die Anzahl der Partikel durch Auszählen fluoreszierender Partikel unter einem Fluoreszenzmikroskop bestimmen.

25 Bei der erfindungsgemäßen Methode kann man ferner als Polyen-Makrolid Filipin verwenden.

Bei der erfindungsgemäßen Methode kann man ferner die Fluoreszenz von Filipin bei einer Wellenlänge von 387 ± 14 nm anregen und die Auszählung bei der Emissionswellenlänge von 30 450 ± 29 nm vornehmen.

Bei der erfindungsgemäßen Methode kann man ferner zur quantitativen Erfassung die Anzahl und/oder Konzentration der fluoreszierenden Partikel mit der bekannten Anzahl und/oder Konzentration von vorgegebenen fluoreszierenden Partikeln vergleichen.

35

5

Bei der erfindungsgemäßen Methode kann man ferner zum Vergleich fluoreszierende Partikel vorgeben, die 0,5- bis 2-mal so groß sind wie die zu quantifizierenden Partikel, insbesondere etwa gleich groß sind.

10

Bei der erfindungsgemäßen Methode kann man schließlich zum Vergleich inerte fluoreszierende Partikel vorgeben.

15

Die im Rahmen dieser Erfindung entwickelte Methode zur Virusquantifizierung kombiniert die Vorteile einer antikörperunabhängigen Färbung der viralen oder bakteriellen Membran und die Quantifizierung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes.

20

Für eine Quantifizierung viraler Partikel über Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop sind die Interaktionen zwischen Cholesterin und Filipin bisher noch nicht genutzt worden. Das liegt wahrscheinlich auch mit daran, daß die Möglichkeit hochqualitative Objektive mit etwa einer 1000x Vergrößerung zur Sichtbarmachung von Viren oder Bakterien einzusetzen, unterschätzt worden ist.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Besteck (kit of parts) zur Quantifizierung von viralen oder bakteriellen Partikeln mit cholesterinhaltiger Hülle, umfassend

30

- ein fluorogenes Polyen-Makrolid und
- (als fakultativen Bestandteil) fluoreszierende Partikel als Vergleichs-Standard.

35

Bei dem erfindungsgemäßen Besteck kann der Vergleichs-Standard in einem wässrigen Medium vorliegen.

5 Ferner können bei dem erfindungsgemäßen Besteck die fluores-
zierenden Partikel des Vergleichs-Standards inerte Partikel
sein.

10 Ferner können bei dem erfindungsgemäßen Besteck die fluores-
zierenden Partikel des Vergleichs-Standards 0,5- bis 2-mal so
groß sein und insbesondere etwa so groß sein wie die zu quan-
tifizierenden Partikel.

15 Schließlich kann das erfindungsgemäße Besteck durch Filipin
als Polyen-Makrolid gekennzeichnet sein.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist schließlich die
Verwendung eines fluorogenen Polyen-Makrolids, insbesondere
von Filipin, zur Quantifizierung von viralen oder bakteriel-
len Partikeln mit cholesterinhaltiger Hülle.

Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung und unter
Bezugnahme auf Beispiele und Figuren detaillierter erläutert.

25 Figur 1 zeigt: die Markierung der viralen Membran von 4070A
MLV's mit Filipin. a) 4070A MLV produziert von NIH3T3 nach
Transfektion mit dem 4070A-MLV-Provirus und dem retroviralen
Vektor pLEIN. Die Viren wurden nach der Fixierung auf Glasob-
jektträgern durch Polybrene mit Filipin markiert; b) Negativ-
kontrolle; Überstand von mock-transfizierten NIH3T3; c)
30 Texas-Rot-markierte 100 nm große Beads. Die Beads wurden
ebenfalls mit Polybrene auf Glasobjektträger fixiert und die-
nen als Größenvergleich mit den circa 100 nm großen viralen
Partikeln und als Standard für die Quantifizierung; fluores-
zenzmikroskopische Aufnahmen, Originalvergrößerung 1000x
35 (Ölimmersionsobjektiv)

5 Färbung viraler Partikel am Beispiel von 4070A MLV

Für die Quantifizierung der viralen Partikel werden die fluo-
rogenen Eigenschaften von Filipin ausgenutzt. Filipin mar-
kierte Viren können im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht
(Anregung 387 nm, Emission 450 nm) und quantifiziert werden
10 (siehe Figur 1). Die Quantifizierung der physischen viralen
Partikel erfolgt über den direkten Vergleich mit Texas-Rot-
markierten "Beads", die dem virushaltigen Überstand vor der
Fixierung in bekannter Konzentration zugesetzt wurden (siehe
Kapitel Methodik, Abschnitt Quantifizierung).

15 Vorteile der Filipinfärbung gegenüber anderen Quantifizie- rungsmethoden

Die Filipinfärbung weist einige Vorteile auf: sie ist einfach
und schnell durchführbar (Zeitaufwand unter 2 Stunden). Der
Vergleich mit der Quantifizierung der "strong-stop"-cDNA
20 zeigt, daß sie bis zu 40 mal sensitiver ist (vergleiche Ta-
belle 1). Die Methode erfordert aufgrund der Spezifität für
Cholesterin keine langwierigen Optimierungen, wie sie häufig
bei immunhistochemischen Färbungen notwendig ist, und sie ist
25 unabhängig von virusspezifischen Antikörper. Dies ist gerade
bei Viren, für die keine Antikörper zur Verfügung stehen von
Vorteil. Die viralen Partikel können mit einem gängigen Fluo-
reszenzmikroskop, wie es in jedem biologischen Institut zu
finden ist, sichtbar gemacht werden. Einzige Bedingung ist
30 die Sicherstellung einer 1000x Vergrößerung und das Vorhan-
densein eines entsprechenden Filtersatzes. Beides ist jedoch
mit einer einfachen Aufrüstung des Mikroskopes möglich. Ein
weiterer Vorteil dieser Partikelfärbung ist der generelle
Einsatz bei allen Virusarten, die über eine cholesterinhal-
35 tige Hülle verfügen (z.B. HIV, Masernvirus, Influenza-Virus).

5 **Tabelle 1: Vergleich der Partikelzahlbestimmung mit cDNA-Messung und Filipinmarkierung von 4070A MLV.**

Zelllinie	cDNA-Partikel [Partikel/10⁶ Zellen/24h]	filipinmarkierte Partikel [Partikel/10⁶ Zel- len/24h]
NIH3T3	3,1×10 ⁷	1,5×10 ⁸
BHK-A	3,7×10 ⁶	5,8×10 ⁷
BHK 21B	6,0×10 ⁶	2,6×10 ⁷
TE FlyA7	8,2×10 ⁵	3,2×10 ⁷

10 **Bestimmung der Varianz der Quantifizierung filipinmarkierter viraler Partikel**

Für den Einsatz der Filipinmarkierung zur Quantifizierung physischer viraler Partikel muß die Reproduzierbarkeit der Analysen gewährleistet sein. Dazu wurden neun virale 4070A-
 15 MLV-Proben in Doppelbestimmung gefärbt und jede einzelne Färbung quantifiziert. Aus den Daten wurde die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert berechnet. Diese lag bei 12,5%.

Methodik

Färbung der viralen Membranen

20

Zur systematischen Quantifizierung von Viren, die mit der Plasmamembran der Wirtszelle umhüllt sind, wurde eine Färbungsmethode entwickelt, die unabhängig von Antikörpern ist, da gezielt das Cholesterin der viralen Membran fluoreszenz-
 25 markiert wird. Filipin ist ein Antibiotikum, das auf die Membran-Sterine eukaryotischer Zellen wirkt, wobei es zu Ände-

5 rungen der Membranpermeabilität kommt. Aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften und spezifischen Bindung an Cholesterin kann es zur Anfärbung von cholesterinhaltigen Membranen verwendet werden.

10 Für die Färbung wurden 195 μ l virushaltiger Zellüberstand (filtriert; 0,45 μ m) mit 4 μ l Polybrene (0,4 mg/ml) und 1 μ l Texas-Red-markierter Fluoreszenzpartikel (Molecular Probes, Durchmesser 100 nm, $3,6 \times 10^7 / \mu$ l) vermischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur in 8-Loch-"Chamber-Slides" inkubiert. Nachfol-

15 gend wurden die Proben dreimal mit 1xPBS gewaschen, 10 min mit Glycin (1,5 mg/ml) und anschließend 30 min mit Filipin (0,05 mg/ml) inkubiert. Die Präparate wurden dreimal mit 1xPBS gewaschen, mit Fluoreszenzeinschlußmedium (Dako) überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt.

20 1xPBS: 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,2 mM NaHPO₄; 14,7 mM KH₂PO₄; pH 6,8 - 7,0 als 10x Stammlösung von GibcoBRL, als Gebrauchslösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt

25

Detektion der gefärbten Viren

Die Bestimmung der Anzahl der viralen Partikel eines virus-

haltigen Zellüberstandes erfolgt mit Hilfe von fluoreszenz-

30 mikroskopischen Aufnahmen (1000x Vergrößerung, 100er Ölimmersionsobjektiv). Die Visualisierung der Fluoreszenzpartikel erfolgte mit Filtern der Wellenlängen 595 / 615. Die Filipinsignale können mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes detektiert werden (Filter Set XF113 von Omegafilters, Anregung 387

35 nm (28), Emission 450 nm (58)).

5 Quantifizierung der filipinmarkierten viralen Partikel

Für die Quantifizierung werden vom selben Präparatausschnitt Aufnahmen der filipinmarkierten Viren und der fluoreszenzmarkierten Beads gemacht. Für eine statistisch signifikante Auswertung der Quantifizierung sollten mindestens sieben Aufnahmen aufgenommen werden (je für Viren und Beads). Die auf den Bildern sichtbaren Viren und Beads werden gezählt. Die Bestimmung der Konzentration der Viren erfolgt mit Formel 1. Die Berechnung wird durch den Einsatz der Beads mit einer bekannten Konzentration möglich.

$$\frac{c_{\text{Beads}} \times A_{\text{Virus}}}{A_{\text{Beads}}} = c_{\text{Virus}} \quad (1)$$

20 c_{Beads} - Konzentration der Beads [Anzahl/ml]

c_{Virus} - Konzentration der Viren

A_{Beads} - Anzahl der Beads pro Bild

A_{Virus} - Anzahl der Viren pro Bild

25 Zusammengefaßt wurde erfindungsgemäß eine neue Methode zur Quantifizierung von Viren entwickelt, die über eine cholesterinhaltige Membran verfügen. Es handelt sich dabei um eine antikörperunabhängige Färbung, bei der durch das Antibiotikum Filipin spezifisch die Cholesterinmoleküle der viralen Membran markiert werden. Filipin weist fluorogene Eigenschaften auf und kann mit einem Filtersatz für das bfp ("blue fluorescence protein"; Anregung bei 387 nm, Emission bei 450 nm) visualisiert werden. Durch diese Fluoreszenz können die Viren im Fluoreszenzmikroskop bei 1000X Vergrößerung sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung erfolgt über den direkten

- 5 Vergleich mit 100 nm großen fluoreszenzmarkierten Partikeln
(z.B. Texas-Rot-markiert), deren Konzentration bekannt ist.

Definitionen, Abkürzungen

- 10 4070A MLV: Maus-Leukämie-Virus, der in der Lage ist, die Zellen einer Vielzahl von Organismen zu infizieren

reverse Transkriptase: Enzym zur Umschreibung von RNA in DNA

- 15 "strong-stop"-cDNA: wird in viralen Partikeln des 4070A MLV von der reversen Transkriptase gebildet und dient der Quantifizierung der viralen Partikel

- immunhistochemische Färbungen: fluoreszenzmarkierte Antikörper binden an spezifische Oberflächenstrukturen und können im
20 Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden

Beads: Bezeichnung für kugelförmige Partikel

5 **Literatur**

- [7] Pizzato M. et al., Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction, *J. Virol.* 73: 8599-8611 (1999)
- [46] Hammerstedt M. et al., Minimal exclusion of plasma membrane proteins during retroviral envelope formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7527-7532 (2000)
- [84] Towers G.J. et al., One step screening of retroviral producer clones by real time quantitative PCR, *J. Gene Med.* 1: 352-359 (1999)
- [85] Müller K. et al., Real time detection of retroviruses by PCR, *J. Gene Med. Supplement to volume 1*: 46 (1999)
- [103] Bierley S.T. et al., A comparison of methods for the estimation of retroviral burden, *Dev. Biol. Stand.* 88: 163-165 (1996)
- [106] Goff S. et al., Isolation and properties of Moloney murine leukemia virus mutants: use of a rapid assay for release of virion reverse transcriptase, *J. Virol.* 38: 239-248 (1981)
- [143] Hofmann-Lehmann R. et al., Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one- versus two-enzyme systems, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 1247-1257 (2000)
- [144] Schutten M. et al., Development of a real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma, *J. Virol. Methods* 88: 81-87 (2000)
- [145] Whitefield G.B. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 77: 4799-4801 (1955)

- 15

Ansprüche

1. Methode zur Quantifizierung viraler oder bakterieller Partikel mit cholesterinhaltiger Hülle, bei der man die Partikel mit einem fluorogenen Polyen-Macrolid anfärbt und danach die Fluoreszenzsignale der einzelnen Partikel quantitativ erfasst.
2. Methode nach Anspruch 1, wobei man die Methode auf Retroviren, Orthomyxoviren, Paramyxoviren, Arteriviren, Togaviren, Bunyaviren, Rhabdoviren, Filoviren, Arenoviren, Coronaviren, Herpesviren, Flaviviren, Hepadnaviren, Pockenviren oder Iridoviren anwendet.
3. Methode nach Anspruch 1 oder 2, wobei man die Methode auf HIV, Masernvirus, Influenza-Virus, Maus-Leukämie-Virus oder Mykoplasmen anwendet.
4. Methode nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der man die Anzahl der Partikel durch Auszählen fluoreszierender Partikel unter einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.
5. Methode nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der man als Polyen-Makrolid Filipin verwendet.
6. Methode nach Anspruch 5, bei der man die Fluoreszenz von Filipin bei einer Wellenlänge von 387 ± 14 nm anregt und die Auszählung bei der Emissionswellenlänge von 450 ± 29 nm vornimmt.

7. Methode nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der man zur quantitativen Erfassung die Anzahl und/oder Konzentration der fluoreszierenden Partikel mit der bekannten Anzahl und/oder Konzentration von vorgegebenen fluoreszierenden Partikeln vergleicht.
8. Methode nach Anspruch 7, bei der man zum Vergleich fluoreszierende Partikel vorgibt, die 0,5- bis 2-mal so groß sind wie die zu quantifizierenden Partikel, insbesondere etwa gleich groß sind.
9. Methode nach einem der Ansprüche 7 bis 8, bei der man zum Vergleich inerte fluoreszierende Partikel vorgibt.
10. Besteck (kit of parts) zur Quantifizierung von viralen oder bakteriellen Partikeln mit cholesterinhaltiger Hülle, umfassend
 - ein fluorogenes Polyen-Makrolid und
 - (als fakultativen Bestandteil) fluoreszierende Partikel als Vergleichs-Standard.
11. Besteck nach Anspruch 10, bei dem der Vergleichs-Standard in einem wässrigen Medium vorliegt.
12. Besteck nach Anspruch 10 oder 11, bei dem die fluoreszierenden Partikel des Vergleichs-Standards inerte Partikel sind.
13. Besteck nach einem der Ansprüche 10 bis 12, bei denen die fluoreszierenden Partikel des Vergleichs-Standards 0,5- bis 2-mal so groß sind und insbesondere etwa so groß sind wie die zu quantifizierenden Partikel.

- THE** **NEW** **YORK** **PUBLIC** **LIBRARY**

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung viraler Partikel mit cholesterinhaltiger Hülle, bei dem die viralen Partikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Filipin 10 angefärbt werden und die Anzahl der viralen Partikel durch Auszählen der fluoreszierenden Partikel unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt wird.

4
3
2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100